

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-150857
(43)Date of publication of application : 13.06.1989

(51)Int.CI. G01N 33/543

(21)Application number : 63-280551 (71)Applicant : MILES INC
(22)Date of filing : 08.11.1988 (72)Inventor : LEWIS LYNETTE A
MESSENGER LOWRY
YEAGER FRANCES M
YIP KIN F

(30)Priority
Priority number : 87 118469 Priority date : 09.11.1987 Priority country : US

(54) LATEX AGGLUTINATION IMMUNOASSAY AND REAGENT KIT UNDER PRESENCE OF HEMOGLOBIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To eliminate the possibility where a nonspecific agglutination of latex reagent occurs due to the presence of hemoglobin in a blood sample.

CONSTITUTION: An analysis target in a blood sample due to latex agglutination immunoassay is measured. Then, a blood sample and antianalysis target antibody that is bound to water-suspension latex particle or a polyvalent latex antibody reagent containing the fragment and an analysis target is only monovalent, a water-based reaction mixture is generated by blending the antianalysis target antibody or an agglutination reagent that contains a number of epitopic bound sites regarding the fragment. The agglutination obtained in the water-based reaction mixture is measured as a function of an analysis target in a blood sample.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑪ 公開特許公報 (A) 平1-150857

⑫ Int. Cl. 1
G 01 N 33/543識別記号 厅内整理番号
F-7906-2G
K-7906-2G

⑬ 公開 平成1年(1989)6月13日

審査請求 未請求 請求項の数 31 (全13頁)

⑭ 発明の名称 ヘモグロビンの存在下におけるラテックス凝集イムノアッセイ
 ⑮ 特願 昭63-280551
 ⑯ 出願 昭63(1988)11月8日
 ⑰ 优先権主張 ⑯ 1987年11月9日 ⑯ 米国(US) ⑯ 118469
 ⑱ 発明者 リネット・エー・ルイ アメリカ合衆国、インデアナ 46526、ゴーシエン、オース
 セイジ・ドライブ 57417
 ⑲ 発明者 ローリー・メツセンジ アメリカ合衆国、インデアナ 46530、グレインジャー、
 グリーン・オーツ・コート 17453
 ⑳ 発明者 フランセス・エム・イ アメリカ合衆国、インデアナ 46540、ミドルリバー、イ
 ーザン・スター・ドライブ 306
 ㉑ 出願人 マイルス・インコーポ レーテッド アメリカ合衆国、インデアナ 46515、エルクパート、ミ
 ルトル・ストリート 1127
 ㉒ 代理人 弁理士 津国肇 外1名
 最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

ヘモグロビンの存在下におけるラテック
ス凝集イムノアッセイ

2. 特許請求の範囲

(1) ラテックス凝集イムノアッセイによって
血液試料中の分析対象物を測定するための分析方
法において、

(a) 血液試料を、水懸濁性ラテックス粒子に
結合した抗分析対象物抗体又はそのフラグメント
からなる多価ラテックス抗体試薬、並びに、分析
対象物が単価である場合には、更に、抗分析対象
物抗体又はそのフラグメントのための多数のエピ
トピックな(epitopic)結合部位を含む凝集試薬と
配合することによって水性反応混合物を生成させ；

(b) 水性反応混合物中において得られる凝集
を血液試料中の分析対象物の閾値として測定する
ことを特徴とし、

その改良点が、pH約8.5以上を有する水性

反応混合物を生成させ、それによって、血液試料
中のヘモグロビンの存在によるラテックス試薬の
非特異性凝集が起こる可能性を実質的に排除する
ことを含む方法。

(2) 该ラテックス粒子が、約7以下のpHを
有する水溶液中に懸濁した場合に、有効な正味の
表面陰電荷を有する請求項1記載の方法。

(3) 该ラテックス粒子がポリスチレンである
請求項1記載の方法。

(4) 水性反応混合物が、約8.5からその
pHにおいて分析対象物とラテックス試薬との間
の免疫反応性が実質的に減少するpHまでの間の
pHを有するように生成される請求項1記載の方
法。

(5) 水性反応混合物が、約8.75～約10
の間のpHを有するように生成される請求項1記
載の方法。

(6) 水性反応混合物が、約9のpHを有する
ように生成される請求項1記載の方法。

(7) 粒子凝集抑制イムノアッセイによって

特許平1-150857 (2)

血液溶解産物を含む試験試薬中のヘモグロビン A1c を測定する分析方法であって、

(a) 血液試料、並びに、(i) 水懸濁性ポリスチレンラテックス粒子に結合したヘモグロビン A1c に対する抗体又はそのフラグメントを含む多価抗体試薬、及び(ii)ヘモグロビン A1c のグリケート化ペプチド (glycated peptides) 配列に対応する多數のグリコペプチドを含む凝集試薬を含む試験試薬を含む水性反応混合物を約 8.5 以上の pH を有するように生成する工程を含む方法。

(b) 反応混合物の pH が約 1.0 未満である請求項 7 記載の方法。

(c) 反応混合物の pH が約 8.75 ~ 約 9.5 である請求項 8 記載の方法。

(d) 反応混合物の pH が約 9 である請求項 9 記載の方法。

(e) 血液試料をヘモグロビン変性物によって予め処理し、抗体試薬が変性ヘモグロビン A1c に特異的に結合するモノクローナル抗体又はそ

のフラグメントを含んでいる請求項 7 記載の方法。

(f) (i) 水懸濁性ラテックス粒子に結合している抗分析対象物抗体又はそのフラグメントを含む多価ラテックス抗体試薬；

(ii) 分析対象物が単価である場合には、抗分析対象物抗体又はそのフラグメントのための多數のエピトピック結合部位を含む凝集試薬；及び、

(iii) 試験系成分と血液試料とを配合することによって生成される反応混合物の pH を約 8.5 以上に保持しうるバッファー；を含む、ラテックス凝集イムノアッセイによって血液試料中の分析対象物を測定するための試験系。

(g) 該ラテックス粒子が、約 7 以下の pH を有する水溶液中に懸濁した場合に、有効な正味の表面陰電荷を有する請求項 1.2 記載の試験系。

(h) 該ラテックス粒子がポリスチレンである請求項 1.2 記載の試験系。

(i) 水性反応混合物が、約 8.5 からその pH において分析対象物とラテックス試薬との間の免疫反応性が実質的に減少する pH までの間の pH を有するように生成される請求項 1.2 記載の試験系。

(j) 水性反応混合物が、約 8.75 ~ 約 1.0 の間の pH を有するように生成される請求項 1.2 記載の試験系。

(k) 水性反応混合物が、約 9 の pH を有するように生成される請求項 1.2 記載の試験系。

(l) 分析対象物がヘモグロビン A1c であり、凝集試薬がヘモグロビン A1c のグリケート化ペプチド配列に対応する多數のグリケート化ペプチドを含む請求項 1.2 記載の試験系。

(m) ラテックス粒子がポリスチレンである請求項 1.8 記載の試験系。

(n) バッファーが、反応混合物の pH を約 8.75 ~ 約 1.0 に保持しうるものである請求項 1.9 記載の試験系。

(o) バッファーが、反応混合物の pH を約 9

に保持しうるものである請求項 2.0 記載の試験系。

(p) ヘモグロビン変性物を更に含み、抗体試薬が、変性ヘモグロビン A1c に特異的に結合するモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む請求項 1.9 記載の試験系。

(q) (a) 血液試料及び懸濁化ラテックス粒子を含む水性反応混合物を生成させ、該反応混合物の pH を約 8 以下に保持し、

(b) 該ラテックスの凝聚を血液試料中のヘモグロビン A₀ の閾値として測定することを含む、血液試料中のヘモグロビン A₀ を測定するための分析方法。

(r) 該ラテックス粒子が、約 7 以下の pH を有する水溶液中に懸濁した場合に、有効な正味の表面陰電荷を有する請求項 2.3 記載の方法。

(s) 該ラテックス粒子がポリスチレンである請求項 2.4 記載の方法。

(t) 反応混合物の pH が、約 8 から、その pH においてヘモグロビン A₀ がポリスチレンラ

特開平1-150857 (3)

テックス粒子を凝集させる能力が実質的に減少する pHまでの間の pHに保持される請求項 2 3 記載の方法。

(27) 反応混合物の pHが、約 8～約 4 に保持される請求項 2 3 記載の方法。

(28) (i) ラテックス粒子、及び(ii) ラテック
ス粒子及び血液試料を含む水性反応混合物の pH
を約 8 以下に保持しうるバッファーを含む、血液
試料中のヘモグロビン A₀を測定するための試験
系。

(29) 该ラテックス粒子が、約 7 以下の pHを
有する水溶液中に懸濁した場合に、有効な正味の
表面荷電荷を有する請求項 2 8 記載の試験系。

(30) 该ラテックス粒子がポリスチレンである
請求項 2 9 記載の試験系。

(31) バッファーが、反応混合物の pHを約
8～約 4 に保持しうるものである請求項 2 8 記載
の試験系。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

抗体とラテックス抗体試薬との間の結合によって検出可能な凝集が形成される。ラテックス抗体試薬に結合する凝集試薬と競合する分析対象物の量を増加させることによって、得られる凝集の量を減少させる。

先行技術においては、ラテックス凝集イムノアッセイ法は、血液中の対象とする分析対象物を測定するために主として血清又は血漿試料に対して行なわれている。全血成分が存在することによってラテックス試薬の非特異的凝集が生じることが知られている。したがって、全血を試験することが所望又は必要である状況において、試験結果の正確性が大きな障害を受ける可能性がある。これは、特に、診断学上重要なヘモグロビン誘導体のような赤血球に関連する血液成分の測定において当てはまる。

発明の概要

ここで、反応混合物の pHを約 8.5 以上に保
持することによって、全血試料に関して行なわれ
るラテックス凝集イムノアッセイにおける非特異

本発明は、ラテックス凝集イムノアッセイに基く、血液試料中の分析対象物の測定方法に関する。更に詳しくは、本発明は、試験試料中に存在するヘモグロビンからの非特異的凝集を阻止する方法に関する。本発明は、特に、全血試料中のグリケート化ヘモグロビン (glycated hemoglobin)、例えばヘモグロビン A_{1c} の測定に関する。

ラテックス凝集イムノアッセイは、多価ラテックス抗体試薬と、対応する多価形態の抗原又はハブテンとを結合させることによる検出可能な凝集の形成に基くものである。対象とする分析対象物がラテックス抗体試薬に関してそれ自身多価である場合には、直接的な試験を行なうことができる。しかしながら、対象とする分析対象物が、低分子量ハブテンの場合のように多価でない場合には、かかるハブテン系分析対象物を定量するために競合試験が行なわれる。凝集試薬を、抗分析対象物抗体試薬に関する多數のエピトピック (epitopic) な結合部位を含む系に加える。凝集試

的凝集が効率的に排除されることが見出された。非特異的凝集は、その正味の正電荷性のために、陰電荷ラテックス粒子に非特異的に吸引される、ヘモグロビン A₀と称される天然の未変性ヘモグロビンの存在によるものであると考えられている。試験を高い pHにおいて行なうことにより、ヘモグロビン A₀の正味の電荷が中性化し、ラテックス粒子に対する静電気的吸引力による凝集が起らなくなる。

したがって、本発明は、ラテックス凝集イムノアッセイによる血液試料中の分析対象物の測定方法であって、(a) 血液試料と、水懸濁性ラテックス粒子に結合している抗分析対象物抗体又はそのフラグメントを含む多価ラテックス抗体試薬、並びに、分析対象物が単価しかない場合には、更に、抗分析対象物抗体又はそのフラグメントに関する多數のエピトピックな結合部位を含む凝集試薬とを配合することによって水性反応混合物を生成させ、(b) 水性反応混合物中において得られる凝集を血液試料中の分析対象物の濃度として測定

特開平1-150857 (4)

する方法に関する。本発明においては、約7以下のpHを有する水溶液中に懸濁した際に正味の有効な表面陰電荷を有するラテックス粒子、例えばポリスチレンラテックスを用いることができる。

また、ヘモグロビンによるラテックス粒子の観察される非特異的凝聚によって血液試料中のヘモグロビンAoの測定の基礎も与えられる。反応混合物は、血液試料及び懸濁ラテックス粒子を含み、pHが約8以下に保持されるように生成される。得られる凝聚は試料中のヘモグロビンAoの閾値である。pH8以下においては、ラテックス粒子は、その正味の表面陰電荷を保持し、ヘモグロビンの静電気的吸引力によって凝聚する。

好ましい実施態様の説明

ヘモグロビンA1cとして知られるヘモグロビン誘導体を測定するためのラテックス凝聚イムノアッセイの開発過程において、量応答曲線が、完全な試薬系によるpH7.4における試験実験と、凝聚試薬を存在させないで行なったものとの

間で実質的に同一であることが見出された。ヘモグロビンA1c類縁体ではなく、ウシ血清アルブミンを被覆したラテックスが、血液試料の存在下で凝聚することも見出された。血液試料中の天然ヘモグロビンが対象物になりうると考えられる。血液試料を蛋白分解性酵素ペプシンで処理することによって非特異的凝聚が排除される。β-鎖中のN-末端アミノ基において変性されていない天然ヘモグロビンであるヘモグロビンAoの多価性はペプシン消化によって破壊されるであろう。更に、その後の実験において、ヘモグロビンAoによって、ラテックス粒子が、水性ラテックス懸濁液中のその濃度に比例して凝聚することが見出された。

したがって、ラテックス表面上の陰電荷基、例えばポリスチレン上のスルフェート基と、ヘモグロビン上の正電荷アミノ基、例えば、ヘモグロビンのβ-鎖上のN-末端アミノ基との間のイオン性吸引力によって、ヘモグロビンAoがラテックスと相互作用すると考えられるが、これは本発明

において重要ではないと考えられる。それによって、ヘモグロビンの4量体が、ラテックス粒子の結合による凝聚を引き起こすのに十分な多価正電荷を与える。更に、グリケート化ヘモグロビンのようなヘモグロビン誘導体は、正電荷が減少又は除去されるように変性されており、ラテックス粒子を凝聚させる差動的な能力がヘモグロビンAoと特定のヘモグロビン誘導体との間で生じると考えられる。したがって、ヘモグロビンAoの非特異的凝聚効果を中和するpH条件下で試験を行なうことによって、非特異的なラテックス凝聚を実質的に引き起こすことのない、特定のヘモグロビン誘導体、例えばヘモグロビンA1cに関する試験を行なうことが可能になる。

本発明は、種々のラテックス粒子に基く凝聚イムノアッセイに適用することができる。ラテックスの殆どは、中性のpHにおいて正味の表面陰電荷を有する粒子から成っている。ラテックスの表面陰電荷の間の電荷反発作用は、粒子が懸濁状態で保持されるのに重要なものである。ここで用い

るよう、ラテックスという用語は、水性液中ににおいて不連続な微粒子が懸濁する性質を意味するものと意図される。

本発明において有用なラテックス粒子は、ラテックス凝聚イムノアッセイの分野に詳しい当業者には明らかであろう。通常、かかる粒子は、試験に所望の抗体試薬に関して好適な支持体として機能し、分析の目的に十分な凝聚試薬の存在下で凝聚するために必要な性質を有することが必要とされる。ラテックス粒子は、通常、乳化重合又は懸濁重合によって得られる[Bangs, L.B. (1984) Uniform Latex Particles. Seragen Diagnostics Inc., Indianapolis IN. USA.]. 懸濁乳化重合を用いることもできる[Ugelstad, J. L. (1980) Adv. Colloid and Interface Sci. 13:101-140]。良好なラテックス粒子を市販物の中から選択することができる。ポリスチレン粒子は特に有用である。

ラテックス粒子の密度は、制限されことなく、概して約0.1mg/ml～約0.1g/mlの間

特開平1-150857 (5)

で変化させることができる。ラテックス粒子の殆どは、粗面の微小球状の、制限されることなく約0.04～約1.2μの間で変化させることのできる直徑を有する粒子から成るものである。

抗体試薬のラテックス粒子への結合は、従来技術が適用される領域のものである。通常、該結合は共有結合であっても非共有結合であってもよい。抗体試薬は、全抗体、抗体フラグメント、多官能性抗体凝集物などから成っていてよい。通常、全抗体、又はFab、Fab'又はF(ab')₂のようなIgGフラグメントが用いられる。抗体試薬を、通常の抗血清及びモノクローナル法のような任意の利用可能な方法によって調導することができる。

通常は、ヘモグロビンA₀の正電荷性を中和し、それによって血液試料の存在下でのラテックス試薬の非特異的凝集を排除するには、イムノアッセイ反応を約8.5以上のpHで行なうことである。反応のpHは、もちろん、分析対象物とラテックス試薬との間の免疫反応性が実質

的に減少する点、即ち、有用な試験がもはや得られない点まで到達することのないようにされる。好ましくは、水性反応混合物は、約8.75～約1.0、より好ましくは約9.5未溝のpHを有し、約9.0のpHが特に有用である。この目的のために好適なバッファーは、簡便性及び試験特性に基いて選択することができる。グリシン及びビシン(bicine)バッファーが好ましい。

凝集剤化合物は、凝集イムノアッセイの分野においてよく知られている方法によって調製される。この試薬は、通常の条件においては、抗分析対象物抗体試薬に関する多数のエピトピックな結合部位を含んでいる。かかる部位は、分析対象物自身、又は、試験の目的のために抗体によって結合されるのに十分な能力を保持する好適な類縁体を用いることによって得ることができる。かかる類縁体は、蛋白分析対象物の場合には、合成によって又は消化によって得られる、抗体試薬、例えば、以下の実施例において説明するようなヘモグロビンA1cのグリケート化ペプチ

ド(glycated peptide)残基のためのエピトープ(epitope)を含む好適なフラグメントを含んでいる。

本発明は、潜在的な非特異性抗原物質としてヘモグロビンを含む試験試料の試験に適用することができる。かかる試験試料は、通常、全血又は分離赤血球のような血液使用の溶解産物を含む。

ヘモグロビンA₀がラテックス粒子を凝聚させる能力によってA₀の測定方法も提供される。この実施態様においては、ラテックス粒子が抗体試薬を担持する必要が無く、また、凝集剤化合物も必要とされない。単純にヘモグロビン及びラテックス粒子の水性混合物のpHを約8以下に保持することによって、ヘモグロビンA₀濃度に相関する凝聚を得ることができる。本発明のこの態様に関する有用なpH範囲の下限は、ヘモグロビンA₀がラテックス粒子を凝聚させる能力を失うことが経験的に分かっているpHである。通常、これは約4を超えるpHを要する。

本発明を以下の実施例によって示すが、これら

に限定されるものではない。

実施例

1. 試薬の製造

A. 抗体-ラテックス試薬

必要な材料

- ・ 2%ラテックス懸濁液(直径0.085μのポリスチレンラテックス、Seragen, Indianapolis, IN, USA.)
- ・ 抗体溶液【米国特許第4,647,654号に記載のように調製し、蛋白A-アフィニティクロマトグラフィー(BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA.)によって廃水液から生成したモノクローナル抗体】
- ・ 10 mM-グリシンバッファー、0.02%アジド、pH 9.3
- ・ 100 mM-NaCl

抗体の被覆は0.5%のラテックス濃度で行われ、抗体は、通常、被覆反応において1 mg/mlの最終濃度で用いられる。必要量の抗体を1.0

特開平1-150857 (6)

mMのグリシンバッファー中に希釈し、NaClを加えて最終的な所望の伝導度(0.5~1.8 mho)を与えることによって2倍の濃度の抗体溶液を調製した。等容量の10mM-グリシンバッファーと共に混合することによって、2%のラテックスを2倍の濃度(又は1%)に希釈した。反応は、ラテックス懸濁液を抗体溶液を含む容器内に注ぐことによって開始された。ラテックスを加える際に、抗体溶液を電磁攪拌棒で攪拌した。溶液は全て室温下にあった。電磁攪拌プレートからの加熱が起こらないように容器を絶縁して、混合を一晩(少なくとも15時間)続けた。これは、容器を、絶縁のために約1インチの空間をとって攪拌プレート上に懸下することによって行なうことができた。

15時間の混合後、得られた懸濁液を、Sorvall SS-34ローター(DuPont, Wilmington, DE, USA.)用のポリプロピレン遠心管に等しく(各管に約10ml)分配した。懸濁液を15,000rpm(2700×g)で60分遠心分離し

た。上澄みをデカントした。ペレットを、所望の過酸化蛋白(例えば、Miles Inc., Elkhart, IN, USA.から得られる1%プロテアーゼ避難ウシ血清アルブミン(BSA-pf)]を含む10mM-グリシンバッファーで2回洗浄した。ペレットを洗浄するために、管中の元の容量に等しい量の洗浄溶液を加えた。ペレットを、激しく攪拌し、短時間(1回あたり10~15秒)音波処理することによって再懸濁させた。最初の再懸濁後、吸着ラテックスを再遠心分離する前に室温で1時間放置した。最初の再懸濁及び遠心分離の後、ペレットが完全に分散したら直ちに再懸濁液を遠心分離した。第2の洗浄の後、ペレットを、最初の反応容量と等しい容量中に再懸濁した。懸濁液を0.8μのフィルターを通して沪過し5℃で保存した。

元の上澄み液、第1及び第2の洗浄からの上澄み液及び最終試料の100倍希釈液の546nmの吸光度を測定することによって濃度を測定した。これら吸光度の合計は100%であるか又は

0.5%ラテックスと等しいと仮定した。最終試料の吸光度を、100%を算出するために用いられる吸光度の合計で割った。最終試料の100倍希釈液の吸光度に100をかけて最終試料の吸光度を得た。

図:

試料	A...
上澄み液	0.044
第1の洗浄液	0.034
第2の洗浄液	0.021
最終試料(100倍希釈)	0.051 × 100 = 5.1
100% (又は0.5%ラテックス)	
= 5.10 + 0.044 + 0.034 + 0.021 = 5.199	
最終試料のラテックス濃度	
= (5.1/5.199) × 0.5% = 0.49%	

B. 凝集試験

ポリ(アスパラギン酸)を、Albert J. Chromatography 265:23 (1983)の方法にしたがって調製した。

アミノエタノール(80ミリモル)、及び、

4.9ジオキサー-1,12-ドデカンジアミン(20ミリモル)を、アルゴン下でジメチルホルムアミド(DMF)中に溶解した。溶液をポリ(アスパラギン酸)(10ミリモル)及びDMFの溶液で処理した。反応を、室温で1時間、次に70℃で2時間攪拌した。次に、混合物を冷却し、液体の大部分を減圧下において蒸発させることによって除去した。油状の残渣をエーテルで、次に四テトラヒドロフランで繰り返し洗浄した。生成物を凝固させ、沪過によって回収した。粗生成物を水中に溶解し、pHを中性に調節した。次に、溶液をBioRad P6-DG脱脂ゲルカラム(BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA.)を用いて精製した。アミノ官能化ポリマーを含むフラクションをブルーし、凍結乾燥した。

ポリマー上のアミノ基の数を、Habeeb's TNBS試験[Anal. Biochem. 14:328-336 (1966)]によつて測定すると、ポリマー1mgあたり22個であることが分かった。

アミノ官能化ポリ(アスパラギン酸)(10.7

特開平1-150857 (7)

mg) 及びSMCC (30 mg) をDMF中に溶解した。反応を室温で2時間攪拌した。水水を混合物に加え、BioRad 6P-DGゲルカラムを用いて活性化ポリマーを混合物から分離した。次に活性化ポリマーを、ヨーロッパ特許第185,870号に記載の方法によって調製されたグリケート化ペプチド：



(20 mg) と室温で3分間反応させた。反応後、6P-DG ゲルカラムを用いて生成物を再精製し、凍結乾燥した。

活性化ポリマー上のマレイミド基の数をPDS試験[Grassetti及びMurray, Arch. Biochem. Biophys. 119:44-49 (1967)]によって測定すると、ポリマー1 mgあたり0.46マイクロモルであることが分かった。また、ポリマー上のGlic-ペプチドの量を、チロシンに関する275 nmにおけるモル吸光係数を用いて、

UV／可視光吸収測定によって測定すると、ポリマー1 mgあたり0.46マイクロモルであることが分かった。

C. ウシ血清アルブミン被覆ラテックス

2%ラテックス溶液(4 ml)を、1%プロテアーゼ避難BSAを含む10 mM-グリシンバッファー(12 ml)と混合した。混合物を簡単に音波処理した。

2. BSA被覆ラテックスとヘモグロビンAoとの相互作用

I. pH = 7.4

BSA被覆ラテックスを、50 mM-リン酸ナトリウムバッファー、0.05% BSA、0.02%ナトリウムアジド(pH=7.4)中で0.036%の濃度に希釈した。ラテックスを、種々の既知Ao濃度を有する変性血液試料と混合した。550 nmにおける吸光度の変化を室温において長時間にわたって記録し、図1に示した(ヘモグロビンAo濃度：A=99.5%、B=96%、C=90%、D=86%、E=78

%、F=71%)。

II. pH = 9.0

50 mM-グリシン、80 mM-塩化ナトリウム、0.05% BSA、0.02%ナトリウムアジド(pH=9.0)中で0.05%に希釈したBSA被覆ラテックスを用いて実験を繰り返した。どの血液試料を加えても凝集は観察されなかつた。

3. ヘモグロビンAo凝集に対するpHの効果

A. 試験

吸着ラテックス

濃縮吸着ラテックスを、BSA-pH 0.05%及びナトリウムアジド0.1%を含む200 mM-グリシンバッファーを用いて適当な濃度に希釈した。濃度4%のマンニトールもバッファー中に存在させてよい。希釈後、吸着ラテックス溶液を簡単に音波処理した(5~10秒)。

凝集剤

凝集試薬の作用溶液を1.0 mg/ml保存水溶液から調製した。保存溶液を、BSA-pH

0.1%及びナトリウムアジド0.1%を含有する20 mM-ホスフェートバッファー(pH 6)を用いて希釈することによって10 μg/ml溶液を調製した。

血液をベースとした標準試料及び臨床試料

血液をベースとした標準試料及び臨床試料は使用前に変性されなければならない。試験において用いるために、血液試料を、Ames Aliquot混合器(Miles Inc., Elkhart, IN, USA.)のような振盪混合器によって良く混合した。次にこれらの試料を、変性剤／酸化体(3 M-NH₄SCN、2 mg/ml-K₃Fe(CN)₆、10 mM-Tris、pH 7.5)で1:31に希釈した。変性剤中にフェリシアニドが存在することによって、希釈試料又は標準試料をヘモグロビン濃度の測定に用いることが可能になった。試料を少なくとも1.5秒間放置した後、OPTIMATE™装置(Miles Inc. Elkhart, IN, USA.)上で試験し、蛋白を完全に変性しヘムを酸化させた。

B. HbA1cに因る比濁試験

特開平1-150857 (B)

HbA1cを測定するために OPTIMATE 装置に関する三種の異なる手順を用いた。二つは終点試験であり、そのうちの一方は凝集剤溶液を手動で加える工程を必要とするものであり、もう一方は試験を完全に自動化したものである。第3の試験方法は速度試験である。以下の記載によって三種の試験の概略を説明する。

凝集剤を手動で加える終点試験

1. Chemistry 37のプログラムテストを用いて、以下の試験パラメーターを USER CHEMISTRY No.25 のようにプログラムした。

単位：無し

試験の種類：終点試験

少數位：2

分配法：A

遅延時間 A：1200秒（試薬を分配してから吸光度を読み取るまでの時間）

平衡時間：6秒（吸光度を読み取る前に試料をキュベット内に保持する時間）

読み取り時間：5秒（データを採取する時間、吸光

度は1秒間に7.7回読み取る）

キュベット温度：25°C

標準濃度：無し

ファクター：1000（結果にこのファクターをかけてミリ吸光度単位に変換した）

低 I / A (Abs) : 2.000

高 I / A (Abs) : 2.000 (吸光度の下限及び上限の両方を2.00に設定することによって、OPTIMATEに各試料に関する実際の吸光度を打ち出させる)

低標準：無し

高標準値：無し

吸光フィルター：540nm

移動温度：室温

試料量：10μl

試薬量：0.5ml

2. 試験を開始する前に、ピベッター／希釈器に 100μl 試料シリジン及び 1.0ml 試薬シリ

ンジが装着されていることを確認した。ピベッター／希釈器のタレットを、試料シリジンに関しては 10% (10μl)、試薬シリジンに関しては 50% (0.5ml) に設定した。

3. 少なくとも 50μl の試料を OPTIMATE 試料カップ中にピベットで加えた。

4. ピベッター／希釈器に吸着ラテックス溶液を充填した。

5. Eppendorf Repeater Pipette (容量 1.25ml のチップ、1 に設定) を用いて凝集溶液 25μl を OPTIMATE 反応カップ内に手動で分配した。ブランク試験のカップ No.60 及び過り反応が起こっていない他の全てのカップを取り外した。これらのカップ内に、バッファー (20mM - ホスフェート、pH 6.0, 1% BSA - p.f.、0.1% ナトリウムアシド) 25μl をピベットで加えた。

6. 記載されている全ての指示にしたがって、Chemistry No.25-USER CHEMISTRY No.25 を開始した。次に、OPTIMATE によって自動的に、試料

及び吸着ラテックスを反応カップ内にピベット滴下し、分配し、20分後の吸光度の読みを測定した。

凝集剤を自動的に添加する終点試験

1. OPTIMATE 装置に、1.0ml のシリジンを備えた Gilford Automatic Dispenser を装着した。連絡ケーブルを OPTIMATE の後部の J4 ポートに連結した。この外部分配器は、(a) ユーティリティー 15、セキュリティーコード 988456 を入力する；(b) ユーティリティー 50、チェック = 0、オプション 20 を入力する；この分配器のタレットを 50% (0.5ml) に設定することによって使用可能となる。

2. Chemistry 37-program New Test を用いて、以下の試験パラメーターを USER CHEMISTRY 24 のようにプログラムした。

単位：無し

試験の種類：終点試験

少數位：2

分配法：A 及び B

特開平1-150857 (9)

塔からの分配B：有

分配Aから分配Bまでの時間：5秒

遷延時間A：1200秒

平衡時間：6秒

読取時間：5秒

キュベット温度：25°C

標準温度：無し

ファクター：1000

低I/A (Abs)：2.000

高I/A (Abs)：2.000

低標準：無し

高標準値：無し

吸光フィルター：540nm

移動温度：室温

試料量：10μl

試薬量：0.1ml

3. 試験を開始する前に、ビベッター／希釈器に100μl試料シリンジ及び250μl試薬シリンジが装着されていることを確認した。ビベッター／希釈器のタレットを、試料シリンジに同じく

ては10% (10μl)、試薬シリンジに関しては10% (25μl)に設定した。イムノアッセイブローブがビベッター／希釈器上で用いられていることも確認した。

4. 少なくとも50μlの試料をOPTIMATE試料カップ中にビベットで加えた。

5. ビベッター／希釈器に凝集剤溶液を充填した。

6. 外部分配器に吸着ラテックス溶液を充填した。

7. Chemistry No.24-USER CHEMISTRY No.24を開始し、全ての指示に従った。次に、OPTIMATEによって自動的に、試料及び凝集剤を反応カップ内にビベット滴下し、分配し、5秒後に吸着ラテックスを加えた。20分後に反応の吸光度の読みを測定した。

速度試験

1. OPTIMATE装置に、1.0mlのシリンジを備えたGilford Automatic Dispenserを装着した。連絡ケーブルをOPTIMATEの後部のJ4ポート

に連結した。この外部分配器は、(a) ユーティリティー15、セキュリティーコード980456を入力する；(b) ユーティリティー50、チェック＝0、オプション20を入力する；この分配器のタレットを50% (0.5ml)に設定することによって使用可能となる。

2. Chemistry 37-program New Testを用いて、以下の試験バラメーターをUSER CHEMISTRY 23のようにプログラムした。

単位：無し

試験の種類：動的酵素

少數位：2

分配法：A及びB

塔からの分配B：有

分配Aから分配Bまでの時間：5秒

遷延時間A：20秒

平衡時間：5秒

読取時間：30秒

キュベット温度：30°C

標準温度：無し

ファクター：1000

低I/A (Abs)：2.000

高I/A (Abs)：2.000

吸光フィルター：540nm

移動温度：30°C

試料量：10μl

試薬量：0.1ml

3. 試験を開始する前に、ビベッター／希釈器に100μl試料シリンジ及び250μl試薬シリンジが装着されていることを確認した。ビベッター／希釈器のタレットを、試料シリンジに関しては10% (10μl)、試薬シリンジに関しては10% (25μl)に設定した。イムノアッセイブローブがビベッター／希釈器上で用いられていることも確認した。

4. 少なくとも50μlの試料をOPTIMATE試料カップ中にビベットで加えた。

5. ビベッター／希釈器に凝集剤溶液を充填した。

6. 外部分配器に吸着ラテックス溶液を充填

した。

7. Chemistry No.23-USER CHEMISTRY No.23 を開始し、全ての指示に従った。次に、OPTIMATE によって自動的に、試料及び凝集剤を反応カップ 内にピベット滴下し、分配し、5秒後に吸着ラ テックスを加えた。14秒後にこの反応の吸光度 の読みを測定した。吸光度は全部で30秒間読み 取った。OPTIMATEによって、採取されたデータ及び1分あたりの吸光度の変化の見地から得られる データから線状回帰線が測定された。

ヘモグロビン測定

全ての血液試料に関して、試料中のHbA1c のパーセントを算出するために試料中のヘモグロ ピン濃度を測定しなければならない。HbA1c の測定に用いたのと同一の変性試料を、以下の プロトコール(protocol)を用いたヘモグロビン測 定に用いた。

1. Chemistry 37のプログラムテストを用い て、以下の試験パラメーターを USER CHEMISTRY No.26 のようにプログラムした。

ンジが接着されていることを確認した。ピベッ ター／希釈器のタレットを、試料シリソジに関して は7.0% (7.0 μl)、試薬シリソジに関しては 5.0% (0.5 ml) に設定した。

3. 少なくとも120 μlの試料をOPTIMATE試 料カップ中にピベットで加えた。

4. ピベッタ／希釈器に、200 mM-グ リシン、0.05% BSA-pf及び0.1%ナ トリウムアジドを含むpH 9のバッファーを充填 した。

5. Chemistry No.26-USER CHEMISTRY No.26 を開始し、全ての指示に従った。次に、OPTIMATE によって自動的に、試料及びバッファーを反応 カップ内にピベット滴下し、分配し、5分後の吸 光度の読みを測定した。

計算

OPTIMATEによって与えられた情報をHbA1c (%) の結果に変換するために多段の計算を行な わなくてはならない。

1. 全ての試験実験にラテックスブランク試

単位：無し

試験の種類：終点試験

少數位：2

分配法：A

遅延時間A：300秒

平衡時間：6秒

読み取り時間：5秒

キュベット温度：25°C

標準濃度：無し

ファクター：1000

低I/A (Abs)：2.000

高I/A (Abs)：2.000

低標準：無し

高標準値：無し

吸光フィルター：540 nm

移動温度：室温

試料量：7.0 μl

試薬量：0.5 ml

2. 試験を開始する前に、ピベッタ／希釈 器に100 μl試料シリソジ及び1.0 ml試薬シリ

験 (500 μlラテックス + 30 μlバッファー) を 合ませた。この反応の吸光度を他の全ての結果か ら減じなければならない。

2. 全ての血液試料に関して、反応に対する ヘモグロビンの吸光度の寄与を、USER CHEMISTRY 26から得られた情報を用いて計算した。これから 得られた吸光度の結果を7で割って、血液1.0 μl の吸光度を計算した。次に、この値を上記で得ら れた吸光度の結果から減じた。

3. 標準曲線を算出するために、イムノアッ セイ No.37-Program New Testを用いて毎イムノ アッセイをプログラムした。以下のパラメーター をUSER IMMUNOASSAY No.27のようにプログラムし た。

プロトコール：No. 1

較正值：G1c-ペプチド標準試料（単位 μM-HbA1c）に関して指定され た較正值を入力した。これらは用いた 吸着ラテックスの全部に依存する。他 の全てのパラメーターは重要ではない

特開平1-150857 (11)

が、校正値を供給するために入力しなければならない。

4. イムノアッセイ No. 33 - Immunoassay Calculationsを用いて4つのパラメーター論理標準曲線を作成した。

試験No. : No. 27

計算式：1. 4 パラメータ論理式

G 1 c - ベブチド標準試料に関する吸光度結果（ラテックスプランク値を減じたもの）を入力した。次に、OPTIMATEによって、標準曲線を作成し、曲線及び4つのパラメーターの標準偏差を計算した。式が完成したら、全ての試料に関する吸光度（-ラテックスプランク値、-Hb分配）を入力することによって未知試料のHbA1cを算出した。打ち出された結果がHbA1c濃度(μM)である。

5. 各血液試料におけるヘモグロビン濃度を、USER CHEMISTRY No. 26からの情報を用いて算出した。ヘモグロビン濃度は、まず第1にG/dlの単位で算出され、次にこの情報を用いて存在

するヘモグロビンβ鎖の濃度(mM)を測定した。

$$Hb \text{ (g/dl)} = \frac{\text{CHEM No.26 からの吸光度} \times 16114.5 \times 252}{9.79 \times 1.0 \times 10.000}$$

上式において、
16114.5 = 1個のHbサブユニットの分子量
252 = 倍数因子
9.79 = 1/4ミリモルの吸光係数
10.000 = 単位添加の補整値

mM-βサブユニット中のヘモグロビン濃度：

$$\text{mM-}\beta\text{-Hbサブユニット} = \frac{g/dl Hb \times 10}{64.456} \times 1000 \times 2$$

上式において、
10 = g/dlへの変換係数
64.456 = ヘモグロビン(4つのサブユニット)
の分子量
1000 = mMへの変換係数
2 = Hbに関するβ-Hbへの変換係数

6. ここで、HbA1c濃度及びヘモグロビン濃度(μM)（どちらもβサブユニットに関する

る）が分かり、HbA1c(%)を測定することが可能になる。

臨床的研究

臨床試料(71)を地方の臨床研究室から得、これを、通常のHbA1cアフィニティークロマトグラフィー(Isolab, Akron, OH, USA.)によって試料を試験した。本発明を用いて、上記のようにして試料を試験した。関係を図3に示す。

5. ヘモグロビンA0試験

8.0 mM塩化ナトリウム、0.05% - BSA 及び0.02%ナトリウムアジドを含む5.0 mM-ホスフェート、pH 7.4を用い、上記記載のA1c(%)に関する手順を用いて試料のA0(%)を測定した。代表的な量応答曲線を図4に示す。

上記に本発明を詳細に説明し例示した。明らかに、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく発明の多くの他の変更及び修正を行なうことができる。

4. 図面の簡単な説明

図1は、ラテックス粒子の凝集に対する、ヘモグロビンA0(天然の未変性ヘモグロビン)濃度を変化させることの効果を示すグラフ：

図2は、ヘモグロビンA0がラテックス粒子を凝集させる能力に対するpHの効果を示すグラフ：

図3は、本発明によって得られるHbA1c試験結果と、標準アフィニティークロマトグラフィー法によって得られる結果との関係を示すグラフであり：

図4は、本発明によって得られるヘモグロビンA0の量応答曲線を示すグラフである。

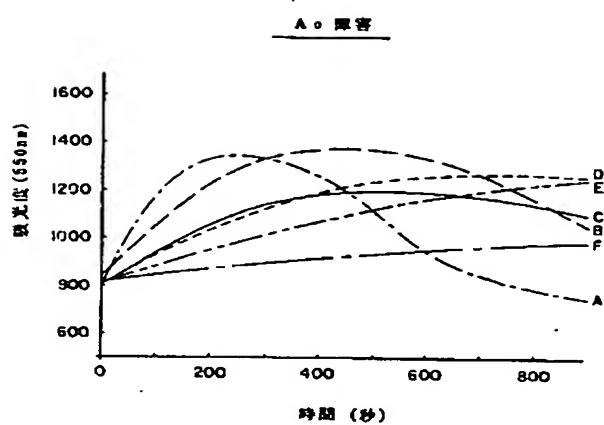


FIG. 1

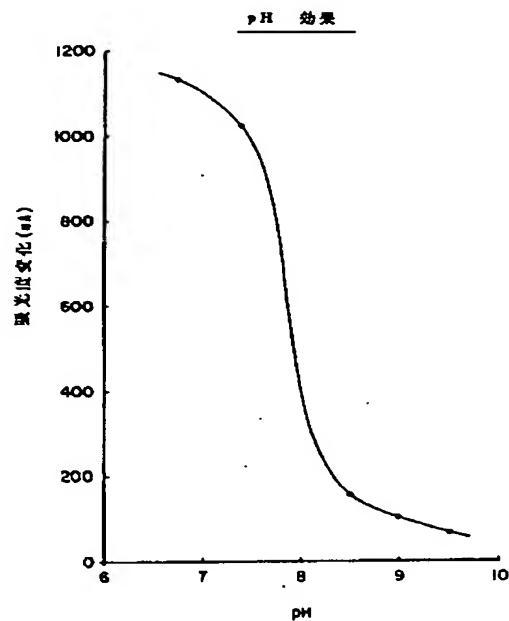


FIG. 2

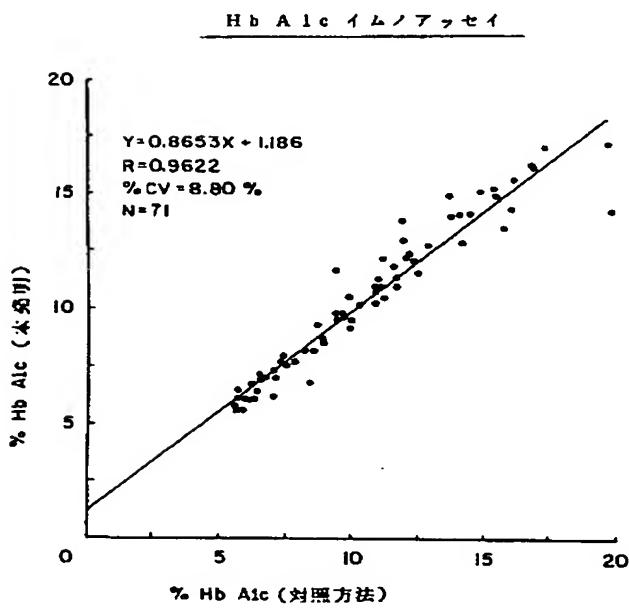


FIG. 3

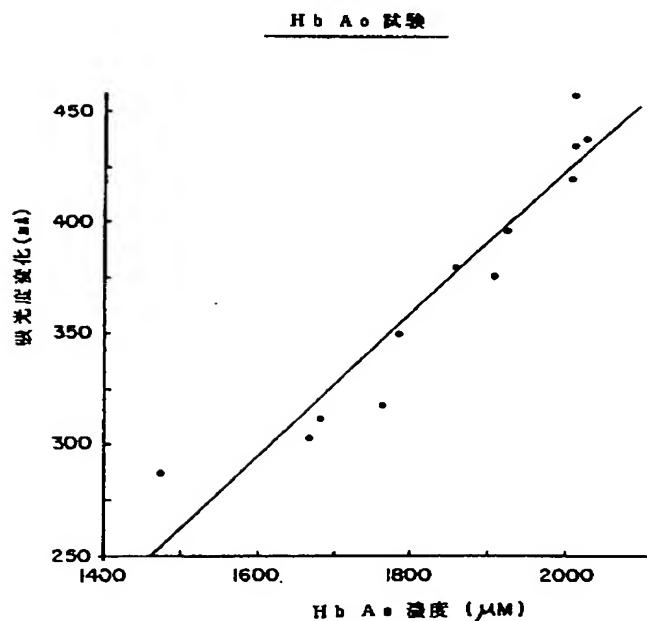


FIG. 4

特開平1-150857 (13)

第1頁の続き

②発明者 キン・ファイ・イツブ アメリカ合衆国、インディアナ 46514、エルクハート、クリークヘイブン・ドライブ 51194

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成8年(1996)10月18日

【公開番号】特開平1-150857

【公開日】平成1年(1989)6月13日

【年通号数】公開特許公報1-1509

【出願番号】特願昭63-280551

【国際特許分類第6版】

G01N 33/543 581

583

【F I】

G01N 33/543 581 J 7055-2J

583 7055-2J

手 税 補 正 書

平成7年8月14日

特許庁長官 高島 幸蔵

1. 事件の表示

昭和63年特許第280551号

2. 発明の名称

ヘモグロビンの存在下におけるラテックス凝集イムノアッセイ

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
名 称 マイルス・インコーポレーテッド

4. 代理人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号
S V A X T Sビル
氏 名 弁理士 (7886) 連 国 取
TEL(3502)7212

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正により減少する請求項の数 17

7. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲の欄

8. 補正の内容 別紙のとおりに補正する

(別紙)

特許請求の範囲

(1) ラテックス凝集イムノアッセイによって血液試料中の分析対象物を測定するための分析方法であって、

(a) 血液試料を、水溶性ラテックス粒子に結合した抗分析対象物抗体又はそのフラグメントからなる多価ラテックス抗体試薬、並びに分析対象物が単価である場合には、更に抗分析対象物抗体又はそのフラグメントのための多数のエピトピックな結合部位を含む凝集試薬、を配合することによって水性反応混合物を生成させ、

(b) 水性反応混合物中に得られる凝集を血液試料中の分析対象物の濃度として測定することを特徴とし、

その改良点が、pH約8.5以上を有する水性反応混合物を生成させ、それによって、血液試料中のヘモグロビンの存在によるラテックス試薬の非特異性凝集が起こる可能性を実質的に排除することからなる方法。

(2) 該ラテックス粒子が、約7以下のpHを有する水溶液中に懸濁された場合に、有効な正味の表面電荷を有する請求項1記載の方法。

(3) 該ラテックス粒子が、ポリスチレンである請求項1記載の方法。

(4) 水性反応混合物が、約8.5からそのpHにおいて分析対象物とラテックス試薬との間の免疫反応性が実質的に減少するpHまでの間のpHを有するよう生成される請求項1記載の方法。

(5) 水性反応混合物が、約8.75~約10の間のpHを有するように生成される請求項1記載の方法。

(6) 水性反応混合物が、約9のpHを有するように生成される請求項1記載の方法。

(7) 粒子凝集抑制イムノアッセイによって血液溶解産物を含む試験試薬中のヘモグロビンA1cを測定する分析方法であって、

(a) 血液試料、並びに、(i) 水溶性ポリスチレンラテックス粒子に結合したヘモグロビンA1cに対する抗体又はそのフラグメントを含む多価抗体試薬、及び(ii)ヘモグロビンA1cのグリケート化ペプチド(glycated peptides)配列に

対応する多數のグリコベブチドを含む凝集試薬、を含む試験試薬からなる水性反応混合物を約8.5以上のpHを有するように生成させる工程を含み；

(b) 血液試料中のヘモグロビンA1cの濃度として用られる凝集を測定する方法。

(8) 血液試料をヘモグロビン変性物によって予め処理し、抗体試薬が変性ヘモグロビンA1cに特異的に結合するモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む請求項7記載の方法。

(9) (i) 水懸濁性ラテックス粒子に結合している抗分析対象物抗体又はそのフラグメントを含む多価ラテックス抗体試薬；

(ii) 分析対象物が単価である場合には、抗分析対象物抗体又はそのフラグメントのための多數のエピトピック結合部位を含む凝集試薬；及び、

(iii) 試験系成分と血液試料とを配合することによって生成される反応混合物のpHを約8.5以上に保持しうるバッファー；

を含む、ラテックス凝集イムノアッセイによって血液試料中の分析対象物を測定するための試薬キット。

(10) 該ラテックス粒子が、約7以下のpHを有する水溶液中に懸濁された場合に、有効な正味の表面荷電荷を有する請求項9記載の試薬キット。

(11) 该ラテックス粒子が、ポリスチレンである請求項9記載の試薬キット。

(12) 水性反応混合物が、約8.5からそのpHにおいて分析対象物とラテックス試薬との間の免疫反応性が実質的に減少するpHまでの間のpHを有するよう生成される請求項9記載の試薬キット。

(13) (a) 血液試料及び懸濁化ラテックス粒子を含む水性反応混合物を生成させ、該反応混合物のpHを約8以下に保持し、

(b) 该ラテックス粒子の凝集を血液試料中のヘモグロビンA0の濃度として測定することからなる、血液試料中のヘモグロビンA0を測定するための分析方法。

(14) (i) ラテックス粒子、及び(ii) ラテックス粒子及び血液試料を含む水性反応混合物のpHを約8以下に保持しうるバッファーを含む、血液試料中のヘモグロビンA0を測定するための試薬キット。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.